FACTORES DE INTERES REFERENTES A LA COLONIZACION DE *HAEMAGOGUS SPLENDENS* PARA EXPERIMENTOS DE TRANSMISION CON VIRUS DE FIEBRE AMARILLA EN EL LABORATORIO (1)

ERNESTO OSORNO-MESA, M. D.
Del Instituto de Estudios Especiales
"Carlos Finlay", Bogotá.

INTRODUCCIÓN.—Por haberse encontrado *Haemagogus splendens* en varias localidades de Colombia (Arauca, Arauquita y Rondón en la Comisaría de Arauca; Galapa y Barranquilla en el Departamento del Atlántico; Chimichagua en el Departamento del Magdalena; Zulia y Villa del Rosario en el Departamento de Santander del Norte) y por haberse comprobado, por medio del examen histo-patológico del hígado, la existencia de fiebre amarilla selvática en algunas de estas localidades, resolvimos intentar la colonización de esta especie con fines experimentales para transmisión de virus amarílico.

Desde el punto de vista de la distribución geográfica, *H. splendens* es importante por haberse hallado en localidades limítrofes con Venezuela, tales como Zulia. En Venezuela, esta especie fue encontrada por los entomólogos Pablo H. Anduze y Otto Hecht en zonas afectadas por la epidemia de fiebre amarilla acaecida en ese país en julio de 1944.

ORIGEN DE LA COLONIA.—La colonia, cuya organización, así como la técnica de manejo y similitud de comportamiento con *Aedes aegypti* en el laboratorio, son el objeto del presente artículo, empezó con 54 hembras procedentes de Zulia, adonde se envió una comisión de vacunación, debido al resultado positivo que tuvo el estudio histopatológico de un hígado enviado de esa región.

---

(1) Los estudios y observaciones en que se basa el presente trabajo se verificaron en el Instituto de Estudios Especiales "Carlos Finlay" que sostienen cooperativamente el Ministerio de Higiene de la República de Colombia y la División Sanitaria Internacional de la Fundación Rockefeller.

Cabe anotar, de paso, que de las ocho especies de *Haemagogus* que hasta ahora hemos encontrado en Colombia, se han hallado machos en la naturaleza, a veces en abundancia, principalmente de aquellas especies que, como *H. splendens*, son muy fáciles de hacer reproducir en cautiverio.

FORMACIÓN DE LA COLONIA.—Cuando hay huevos en número suficiente en las cajas de Petri, los sacamos de las jaulas para almacenarlos en las mismas cajas, dejándolas allí, en período de semidesecación, durante un mínimum de 15 días. Después los sumergimos en agua, algunas veces mezclada con pequeña cantidad de una cocción de hojas de "guamo" (*Inga* spp.).

Las larvas empiezan a nacer inmediatamente después de la sumersión de los huevos. Antes solíamos aguardar por espacio de aproximadamente una semana, a que terminara el nacimiento de las larvas y, pasado este tiempo, verificábamos una segunda desecación, para volverlos a sumergir y así, sucesivamente. La experiencia nos ha enseñado que es necesario esperar dos y hasta tres semanas, porque el nacimiento de las larvas en cualquier lote de huevos es muy irregular en cuanto al factor tiempo. Hay muchos casos en que las larvas nacen, en número apreciable, después de la primera y segunda semana de sumersión.

Cuando nacen las larvas, aguardamos tres días para contarlas y pasarlas a un recipiente, en el cual continúan su ciclo, anotando todos los detalles referentes a la observación de desarrollo, alimentación y mortalidad.

La mezcla que se usa para alimento consiste de partes iguales de avena, germen de trigo, bizcocho de perro y pan integral, finamente pulverizada. Como sucede que, al distribuir esta mezcla en los diferentes recipientes queda suspendida en la superficie del agua, lo cual acarrea la formación de una película que perjudica las larvas, acostumbramos para evitar esto, echar previamente la mezcla en una vasija con agua, que se vierte en otra repetidas veces, hasta que la mayor parte se sedimente; la sacamos luego con un gotero para depositarla en el fondo de las vasijas que contienen larvas. El agua se cambia parcial o totalmente cada tres días.

Las pupas en la colonia de *H. splendens*, las colocamos como las de *A. aegypti*, en un vaso de precipitación.

El tiempo transcurrido desde la sumersión de los huevos hasta el nacimiento de los adultos, en las condiciones ambientales existentes en el laboratorio de Bogotá, es en término medio de 12 a 15 días. Este dato es importante en relación con los cálculos que se hagan de los otros factores, tales como el tiempo para que se manifieste el virus en la circulación periférica del animal inoculado y el período de incubación en los mosquitos. De acuerdo con estos cálculos, se puede mantener un número suficiente de mosquitos en buenas condiciones, disponibles en un momento dado para los experimentos de transmisión.

La aceleración en el ciclo evolutivo de las larvas resulta muy apreciable al combinar los dos factores de alimentación y temperatura, colocando las larvas en la estufa a una temperatura de 30°C. (disminución aproximada de 5 días).

OBSERVACIONES SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE H. SPLENDENS EN EL LABORATORIO.—Es muy grande la analogía del comportamiento en el laboratorio entre *H. splendens* y *A. aegypti.* En cuanto al espacio requerido para el acoplamiento, *H. splendens,* lo mismo que *A. aegypti,* se acopla en dedales de vidrio de 5 x 2½ cms.; en este caso, se aparean en reposo, en posición ventral de ambos ejemplares, fenómeno que se observa con frecuencia aún en jaulas de gran amplitud. Respecto de esta observación, *H. spegazzinii falco* ocupa el término diametralmente opuesto y todavía no hemos logrado que se acople en jaulas de 34½ x 27½ x 35½ cms. y aun de mayores dimensiones.

La hematofagia se manifiesta pocas horas después del nacimiento de las hembras y alcanza su máximum a las 48 horas, después de las cuales se obtiene aproximadamente el ciento por ciento de hembras ingurgitadas.

La rotación de la terminalía en los machos se verifica en pocas horas y la aptitud para el acoplamiento se desarrolla con gran celeridad.

La ovoposición empieza cuatro días después de la comida de sangre, con un promedio de 50 huevos por hembra. Las posturas son muy numerosas y las depositan como las de *A. aegypti* en las cajas de Petri, sin necesidad de poner en ocasiones tarugos de guadua dentro de las jaulas, como sucede con otras especies de *Haemagogus,* para aumentar el número de huevos.

Según las observaciones que habíamos hecho hasta ahora, no solamente en las distintas investigaciones de campo, sino también en el laboratorio, las especies del género *Haemagogus* tienen notable fototropismo positivo, propiedad biológica aprovechable para la búsqueda y colección de adultos en condiciones naturales y también para las diferentes manipulaciones en el laboratorio. Referente a este último factor, *H. splendens*, en cambio, tiene fototropismo negativo y se comporta exactamente igual a *A. aegypti;* es muy frecuente ver ejemplares que se escapan durante el trabajo de rutina, buscando los lugares obscuros para refugiarse, lo mismo que gran cantidad de adultos volando en el extremo de la jaula, donde haya menos luz, como sucede con *A. aegypti.*

(Nota: Podría hacerse un estudio detallado acerca de este fototropismo negativo, pero sus resultados no tendrían mayor trascendencia en el presente estudio, ya que las colonias prosperan sin ninguna dificultad y por eso tan sólo anotamos los hechos fundamentales).

APTITUD DE H. SPLENDENS PARA TRABAJOS DE LABORATORIO.—Para experimentos en el laboratorio, como para investigaciones de campo, *H. splendens* tiene la ventaja sobre las otras especies del género *Haemagogus,* de ser la de más fácil determinación en las hembras, por las bandas basales de escamas nacaradas que presentan en el dorso de todos los segmentos abdominales, las cuales contrastan con las escamas restantes de color azul ultramarino (Plancha I); son verdaderos anillos que contornean los segmentos, estrechos en las partes laterales y ensanchados dorsal y ventralmente. Sin embargo, esta característica puede estar sometida a las variaciones geográficas e individuales de coloración en el grupo especie. Además, este detalle diferencial persiste largo tiempo, aún en hembras que vuelan continuamente y en las cuales la pérdida de escamas se verifica primero en el mesonotum, como es lógico, según el mecanismo del vuelo.

PROCEDIMIENTO PARA TRANSPORTAR MOSQUITOS.—Ultimamente, para el transporte y ovoposición de las hembras, empleamos con buen resultado un dispositivo especial (Plancha II, Fotos 1, 2 y 3), utilizando las vénulas para sangría, ya usadas, de capacidad de 30 cc. Se cortan a una altura de 5 cms. del cuello, llenando éste y algo de la parte ensanchada con una mezcla delgada de agua y yeso del que se usa en ortopedia. Para esto, se coloca la serie de vénulas cortadas sobre una placa de vidrio y se distribuye el yeso con una pipeta de diámetro apropiado. En cada vénula se esmerila un rectángulo para anotar en él, con lápiz común, los datos necesarios y evitar el empleo de lápiz de cera y rótulos de papel engomado. Sobre el yeso se coloca una rodela de cartón corrugado, de color obscuro, cubierta con otra de papel de toalla, que se debe renovar tan pronto termine la digestión de la comida de sangre, para evitar el desarrollo excesivo de hongos en las posturas. En las rejillas metálicas inoxidables se coloca un poquito de algodón hidrófilo, humedecido con agua azucarada.

Una vez arregladas las vénulas, se las coloca en el soporte de madera, en cuya base hay un recipiente de zinc, en el cual se pone algodón envuelto en gasa, que al humedecerlo, establece un grado higrométrico adecuado para asegurar la longevidad de los mosquitos. Según nuestra experiencia con este método, el vapor de agua no se condensa en las paredes de las vénulas, a pesar de los cambios de temperatura.

La técnica que acabamos de describir, facilita las distintas manipulaciones, especialmente para el personal que no esté suficientemente adiestrado.

Nota: FORMAS DE LABORATORIO.—Los cuadros que durante varios años hemos usado para los distintos registros en el procedimiento de colonización de mosquitos (Plancha III), nos han dado éxito completo. Usamos tres formas: para adultos, para huevos y larvas y para pupas.

Por medio de estos cuadros se puede llevar, según se observa, una anotación minuciosa de todos los factores que intervienen, favorable o adversamente, en el desarrollo ascendente o descendente de una colonia, para modificarlos según el caso.

EXPERIMENTOS DE TRANSMISIÓN.—Para los experimentos de transmisión, sacamos de las jaulas la comida azucarada y cubrimos las cajas de Petri que se usan para las posturas y humedad, con tapas de anjeo metálico, cuatro o seis horas antes de hacer picar los mosquitos en el *Aotus* con virus circulante.

Cuando se trata de infectar un lote grande de mosquitos, usamos cajitas especiales de madera, aseguradas por medio de esparadrapo al abdomen afeitado del animal, durante veinte minutos. En estas condiciones, obtenemos el ciento por ciento de hembras de *H. splendens* ingurgitadas, lo mismo que con *A. aegypti.* En cambio, con *H. spegazzinii falco,* a Bates y Roca-García les dio mejor resultado hacerlas picar individualmente en tubos de prueba. La diferencia de comportamiento respecto del fenómeno anotado entre estas dos especies puede depender de las diferentes características fototrópicas.

Los lotes de hembras ingurgitadas, que siempre juntamos con machos varios días antes de picar, para asegurar la longevidad, los colocamos en jaulas de 17½ x 25 x 15 cms., dentro de una estufa a 30°C., para el período de incubación del virus en los mosquitos (Bates, Roca-García, 1945). En estas condiciones, hemos obtenido hasta ahora una longevidad máxima de 54 días.

Después del período de incubación, preferimos hacerlas picar aisladas en tubos, aunque con este procedimiento es más difícil que piquen los *H. splendens,* especialmente cuando hay mucha luz; procedemos así para cerciorarnos, a través del tubo, de si los mosquitos pican, aun cuando no estén ingurgitados. En todo mosquito que esté picando, es muy fácil ver el ángulo típico que forma el labium en la base de la proboscis. Para estimularlos a que piquen, acostumbramos ponerlos, ½ o 1 hora antes de aplicarlos al animal, a una temperatura de 15 a 20°C.

Para separar con precaución, en el laboratorio de Bogotá, las hembras ingurgitadas en un animal con virus circulante, al usar el procedimiento de cajitas, utilizamos una jaula portátil hecha de tela, en cuyo interior se coloca la cajita, que al abrirla, deja los mosquitos en libertad. Esta jaula, con armazón metálica desarmable, lleva dos costados de punto, el superior y el lateral derecho, al estar la manga frente al operador. Estos costados aseguran buena visibilidad para poder apartar, en tubos que se tapan dentro de la jaula, las hembras llenas, de las vacías (Plancha II, Fotos 4 y 5).

RESUMEN

1º Se amplía la distribución geográfica de *Haemagogus splendens,* conocida hasta hoy, anotando su papel importante como probable vector en la naturaleza.

2º *H. splendens* es la especie del género *Haemagogus* que biológicamente representa el eslabón entre este género y *Aedes,* por la gran similitud de su comportamiento en el laboratorio, con *A. aegypti.*

3º Es la especie de más fácil determinación por las hembras.

4º Se da una técnica para el transporte y posturas de huevos de las hembras de mosquitos.

SUMMARY

1º The known geographic distribution of *Haemagogus splendens* is extended, and its role as a probable vector in natural conditions is established.

2º *H. splendens* of all the species of *Haemagogus*, is the one that seems to constitute a biological link between that genus and the genus *Aedes*. (Based on the great similarity of behavior with *Aedes aegypti* under laboratory conditions).

3º The identification of females is most easy.

4º A technique for egg laying and transportation of the adults is described.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis agradecimientos al doctor C. R. Anderson por su estímulo en el presente trabajo; al doctor Carlos Sanmartín, autor de las fotografías; al señor G. Varela, autor de una perfecta acuarela de *H. splendens*, de donde se tomó la fotografía que ilustra esta publicación; al señor N. Vargas y al señor J. V. Acuña por su aporte de material entomológico vivo de *H. splendens*.

REFERENCIAS

Anderson Charles, R., M. D. and Osorno-Mesa, E., M. D.
1946 - The laboratory transmission of yellow fever virus by *Haemagogus splendens*.
The Am. Journ. of Trop. Med., 28: 613-618.

Bates, M. and Roca-García, M.
1945-a - Laboratory studies of the saimirí-haemagogus cycle of jungle yellow fever.
Amer. J. Trop. Med., 25: 203-216, 2 figs.

Bates, M. and Roca-García, M.
1946-b - The development of yellow fever virus in *Haemagogus* mosquitoes.
Amer. J. Trop. Med., 26: 585-605.

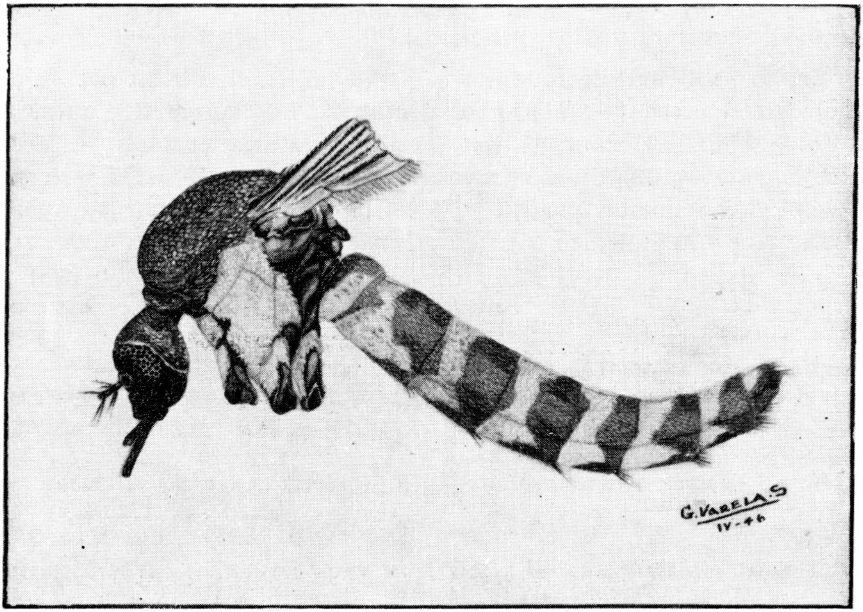
Boshell-Manrique, J. and Osorno-Mesa, E.
1944 - Observations on the epidemiology of jungle yellow fever in Santander and Boyacá, Colombia, September, 1941, to April, 1942.
Amer. J. Hyg., 40: 170-181.

Hovanitz, W.
1946 - Comparisons of mating behavior, growth rate, and factors influencing egg-hatching in South American *Haemogogus* mosquitoes.
Physiological Zoölogy, 19: 35-53, 5 figs.

Kumm, H. W., Osorno-Mesa, E. and Boshell-Manrique, J.
1946 - Studies on mosquitoes of the genus *Haemagogus* in Colombia.
Amer. J. Hyg., 43: 13-28, 1 fig., 6 pls.

Osorno-Mesa, E.
1944 - Organización de una colonia de *Haemagogus equinus* Theobald.
Caldasia, 3, Nº 11, 39-45.

Plancha I


G. VARELA S
IV-46

Haemagogus splendens Williston.

Plancha II

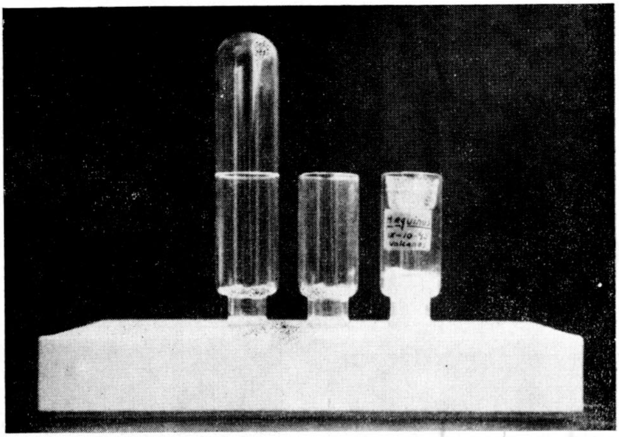


Fig. 1 — Acondicionamiento de las vénulas.

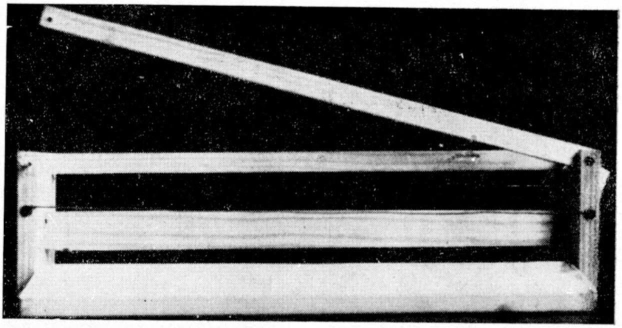


Fig. 2 — Dispositivo para aove y transporte de dedales.

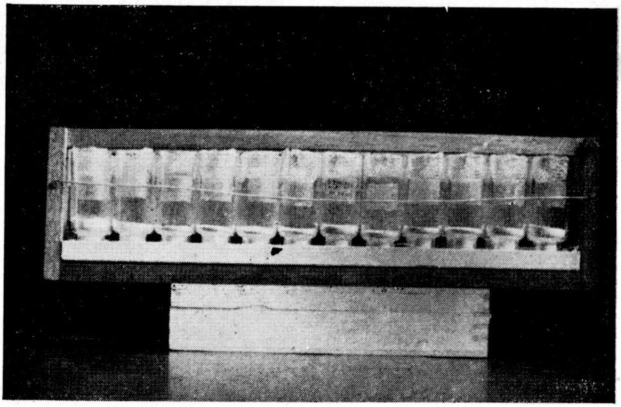
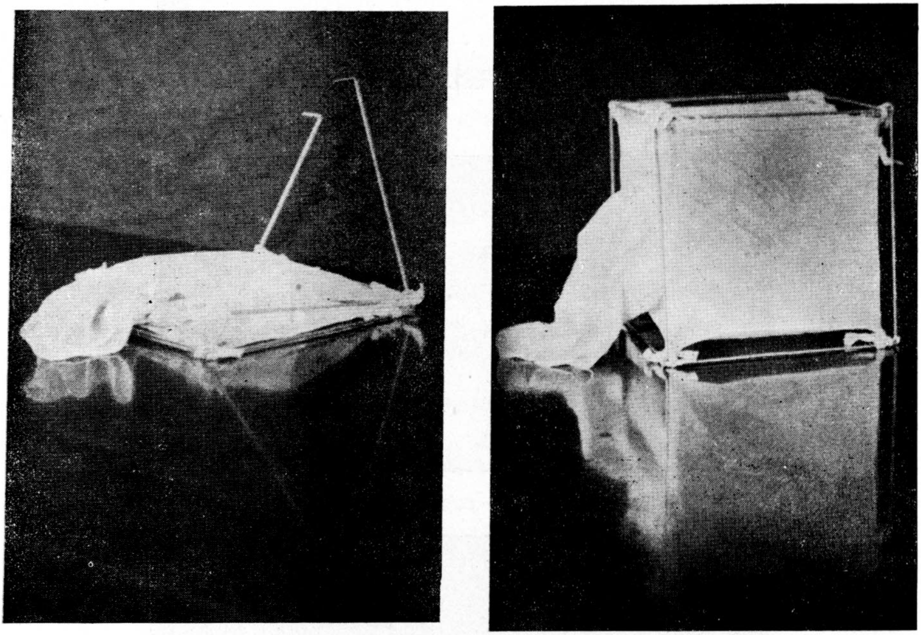


Fig. 3 — Porta-dedales y humedecedor.

Pl. II-a.



Figs. 4 y 5. — Jaula portátil de tela con armazón metálica, desarmable.

Plancha III

Adultos
Haemagogus splendens F1
(Zulia, Norte de Santander)

PUESTOS EN LA JAULA			MORTALID.		SOBREVIV.		POSTURAS		ANOTACIONES
FECHA	HS.	MS.	HS.	MS.	HS.	MS.	LOTE	HVS.	
III-3-46	10	8							
III-4-46	7	11	3	5	14	14			
III-5-46	5	3			19	17			
III-6-46		12			19	29			5 hembras ingurgitaron sangre de curi
III-7-46	3	5			22	34			3 hembras ingurgitaron sangre de curi
III-8-46	7	9	2	8	27	35			
III-9-46	4	6			31	41	1	75	
III-10-46	7	2	1	3	37	40	2	50	
III-11-46	4	3		2	41	41			

Haemagogus splendens F2
(Zulia, Norte de Santander)

ANOTACIONES

Habian nacido algunas larvas del lote #2, antes de la 2ª Sumersión

NACIMIENTOS DE LARVAS

Lotes	Nº de Hvs.	Generación	Fecha de P.	Fecha de S.	2a. Des.	2a. Sum.	III 26	III 27	III 28	IV 8	IV 26	
1	75	F2	III-9	III-25	IV-9	IV-25	5	0	7	0	20	
2	50	F2	III-10	III-20	IV-2	IV-15	21	22	23	26	1º	16
							3	1	0	1	0	15

LOTES	MORTALIDAD	
# 1 - 75 hvs.	III 30	V 2
	3	4
# 2 - 50 hvs.	III 26	IV 23
	2	6

Pupas
Haemagogus splendens F2
(Zulia, Norte de Santander)

FECHA	ENTRAN			ANOTACIONES
	LOTES	Nº		
IV-7-46	1	5		Hay 4 machos y 1 hembra
IV-8-46	1	4		
V-6-46	1	10	3	
IV-5-46	2	3		
IV-27-46	2	7		

Formas de laboratorio, para registro de los datos en colonias de mosquitos.